

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **02-160722**

(43)Date of publication of application : **20.06.1990**

(51)Int.Cl.

A61K 35/78
A61K 9/127
A61K 31/35
A61K 31/70
A61K 35/78

(21)Application number : **63-315080**

(71)Applicant : **NIPPON OIL & FATS CO LTD
RIKAGAKU KENKYUSHO**

(22)Date of filing : **15.12.1988**

(72)Inventor : **HIBINO HIDEHIKO
FUKUDA NOBUO
ASAHI KENICHI
SAKURAI SHIGERU
TAKAHASHI NOBUTAKA**

(54) LIPOSOME PREPARATION AND PRODUCTION THEREOF

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a liposome preparation having excellent stability by treating a flavonoid with an alkaline solution and converting into liposome.

CONSTITUTION: A phospholipid or a mixture of phospholipid and cholesterol is formed in the form of a thin film by reverse-phase evaporation process. A solution of free flavonoid dissolved in an alkaline solution having pH of ≥ 10 is added to the thin film and uniformized by ultrasonic process to obtain a stable emulsion. The objective liposome preparation containing a flavonoid is produced by treating the emulsion with an extruder. The preparation can be infused into a body by intravenous or transperitoneal infusion to keep high flavonoid concentration in the body and is effective as a platelet coagulation inhibitor, a vasodilator, an antihistaminic, an anti-inflammatory, an antispasmodic, an estrone-like agent and a scavenger for free radical, etc.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報 (A) 平2-160722

⑬ Int.Cl.⁵A 61 K 35/78
9/127
31/35
31/70
35/78

識別記号

AEM X
L
ACB
ABR
AAV W

庁内整理番号

8413-4C
7624-4C
7475-4C
7431-4C
8413-4C

⑭ 公開 平成2年(1990)6月20日

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全5頁)

⑮ 発明の名称 リポソーム製剤およびその製造法

⑯ 特願 昭63-315080

⑰ 出願 昭63(1988)12月15日

⑱ 発明者	日比野 英彦	東京都練馬区旭丘2丁目22番1号
⑲ 発明者	福田 信雄	茨城県つくば市梅園2丁目24番5号
⑳ 発明者	旭 健一	埼玉県和光市諏訪原団地1丁目4番108号
㉑ 発明者	桜井 成	東京都杉並区南荻窪1丁目33番12号
㉒ 発明者	高橋 信孝	東京都杉並区荻窪4丁目27番2号
㉓ 出願人	日本油脂株式会社	東京都千代田区有楽町1丁目10番1号
㉔ 出願人	理化学研究所	埼玉県和光市広沢2番1号
㉕ 代理人	弁理士 舟橋 築子	

明細書

1. 発明の名称

リポソーム製剤およびその製造法

2. 特許請求の範囲

- (1) フラボノイドを含有することを特徴とするリポソーム製剤。
- (2) さらにコレステロールを配合してなる請求項1記載のリポソーム製剤。
- (3) フラボノイドをpH10以上のアルカリ溶液で処理した後、リポソーム化することを特徴とするリポソーム製剤の製造法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、新規なリポソーム製剤に関するものであり、更に詳しくは、リン脂質を用いて製造されるリポソームにフラボノイドを配合してなる安定性に優れたリポソーム製剤およびその製造法に関する。

(従来の技術)

フラボノイドは植物の2次代謝産物の花色素で

多くはグルコースが結合した配糖体であり、フラボン類、イソフラボン類、フラバノン類、カテキン類、アントシアニン類、カルコン類、フラボノール類などの化合物群を含む。このフラボノイドの遊離型やグルコシド型は血小板凝集抑制、血管拡張、抗ヒスタミン、抗炎症、鎮痙、エストロン様、遊離ラジカルのスキャベンジャーなどの薬理的性質を有する。また、脂質系酵素のホスホジエステラーゼ、リポオキシゲナーゼ、シクロオキシゲナーゼ、およびプロテインキナーゼなどに対する制御性が生化学的に知られている。このように広汎な生理活性を有するフラボノイドは、天然物中に存在し、日常の食事中にも微量存在している安全な化合物である点から、特定な治療目的に用いることが考案されてきた(特開昭60-199817号)。

リポソーム素材として使われるリン脂質およびコレステロールは、生物を構成する基本単位である生体膜の構成成分である。特にリン脂質は動物性、植物性の天然物の他に、合成されたものもあるが、主としてホスファチジン酸にコリン、エタ

ノールアミン、セリンの残基が結合したものが使われている。以上のように生体にとって有用であり且つ毒性のない素材を組み合わせた薬剤の開発が望まれていた（特開昭62-95134号）。

（発明が解決しようとする課題）

前述した如く、フラボノイドは多くはグルコースと結合した配糖体として天然に存在するが、その生理活性は、加水分解を受けた遊離型のものに一層強くその効果がある。

配糖体は水への親和性を少し有しているが遊離型は非常に融点が高く、水への溶解度が著しく低下するため、水溶液として用いることが難しい。遊離型は熱水、熱メタノール、熱エタノール、熱含水アルコール、熱アセトンなどで溶解度が向上することが判明しているが、冷却されると直ちに結晶が析出してくるので、医薬品の溶媒としては不適である。有機溶媒ではアプロテック溶剤、高極性非プロトン系溶剤、塩素系溶剤などの一部に溶解するがこれらの溶剤を医薬品の溶媒として生体内に使用することは毒性の観点から難しい。

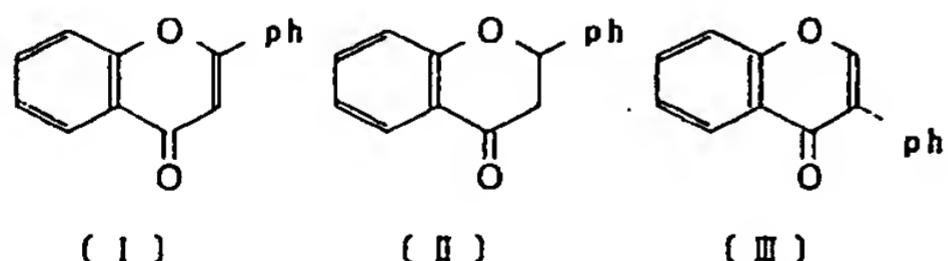
また遊離型のフラボノイドは数個の芳香族系の水酸基を有しているので、これをアセチル化、グルコシド化、メチルエーテル化などの修飾が出来るが、これらの修飾によっても水に対する溶解度は大きくは改善されない。

上記の理由によりフラボノイドの生理活性は、例えば便宜上ピリジン溶液で検定されたり（特開昭60-199817号）、非常に微量しか可溶化出来ないが蛋白質可溶化剤に可溶化して検定されたり、不均一に微量しか分散出来ない増粘剤で懸濁させて検定されたりしてきたが、これらの方法は生体に及ぼす毒性、必要量の確保、医薬品製剤の均質性、および医薬品としての取り扱いなどから直ちには適用出来ない。また、フラボノイドが固体である点から、タブレット、カプセル、顆粒および座薬などへの加工は容易であるが、液剤、シロップ剤などの水性の分散物としては、界面活性剤を用いて乳化しても、加工し難い点から、これらの問題点を解決した剤型加工法の出現が望まれていた。

（課題を解決するための手段）

本発明は、フラボノイドを含有することを特徴とするリポソーム製剤であり、好ましくは、さらにコレステロールを配合してなるリポソーム製剤である。また、本発明のリポソーム製剤の製造法は、フラボノイドをpH10以上のアルカリ溶液で処理した後、リポソーム化することを特徴とする。

本発明に用いられるフラボノイドには下記の基本骨格を有する化合物を挙げることが出来る。



（式中のphはフェニル基を示す。）

その具体例としては、次の化合物を挙げることができる。

(I) はフラボン類であり、クリシン、トリンキン、アピゲニン、コスモシインなどがある。

(II) はフラバノン類であり、ビノセンブリン、ナリンゲニン、セリブルビンなどがあり、3位に

水酸基を有するフラボノール類にはケンフェロール、アストラガリン、クエルセチンなどがあり、さらに水酸基が増したジハイドロフラバノール類にはビノバンクシン、アスチルビル、フスチンなどがある。

(III) はイソフラボン類でありダイゼイン、ゲニスタイン、ゲニスチンなどがある。

天然フラボノイドは前述の如きフラボノイド骨格の主として7位に、まれに5位、3位に单糖および多糖が結合した配糖体として存在することが知られているが、本発明においては、これらの配糖体をエマルションで酵素的に加水分解したり、硫酸との煮沸やメタノール性塩酸との煮沸で化学的に加水分解した遊離型のフラボノイドが好ましい。

従来報告されているフラボノイドの分化誘導活性に關し、構造既知なフラボノイド配糖体の活性は、糖を含まないフラボノイド化合物のそれより低いことが証明されている（キノシタ・ティ、サンカワ・ユー、タカク・ティ、アサヒ・ケイ、J.

Pharmacobi-Dyn 8: S-64, 1985). また、遊離型のフラボン類の代表例であるアピゲニンは、ダリアやフジモドキの花、高粱の包葉、種子、茎に含まれており、これらの天然産の遊離型のフラボノイドも利用できるが、遊離型のイソフラボン類の代表的であるゲニステインはゼンブレンらによって合成法が確立されており (*Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* 19, 277, 1959)、その他多くの遊離型のフラボノイドが多数の化学合成研究者から合成法が報告されており、これらの化学合成品の遊離型のフラボノイドも利用できる。さらに市販の遊離型フラボノイドも利用できる。

そこで、本発明者らは遊離型フラボノイドの均一溶液を得るため各種溶剤に対する遊離型フラボノイドの溶解能を検討した。そして、本発明者は遊離型フラボノイドには、2~6個の芳香族系水酸基があることに着目した。何故なら遊離型フラボノイド類の水への不溶化はこの芳香族系水酸基によると推定されるからである。そのため、各種アルカリに対する遊離型フラボノイド類の溶解能

を検討した。各種アルカリの0.1M溶液におけるpH値と溶解能を例示すると、醋酸ナトリウムは10.9で一部溶解し、炭酸カリは11.6、炭酸ナトリウムは12.0、水酸化カリは13.6、水酸化ナトリウムは13.7でそれぞれ溶解する。

pH10未満ではフラボノイドを溶解することができないが、pH値が10以上を示すアルカリ溶液は溶解能を示すことが判明した。

しかし、このアルカリ溶液による生体への直接投与は消化器官中に存在する生体成分との結合体の形成や生体内分解酵素による早急な分解により、有効な治療効果を發揮する遊離型フラボノイドの濃度を達成することは難しい。そのため、その脂溶性と二分子膜構造により生体成分との結合防止、分解酵素からの分解および細胞などと相互作用しやすい点から薬効増強が期待できるリポソーム製剤を検討した。

そこで本発明者らはリポソーム素材であるリン脂質やコレステロールが遊離型フラボノイドを溶解するアプロテック溶剤に溶解することに着目し、

逆相蒸発法によるリポソームの調製を行った。しかし、アプロテック溶剤中で均一に溶解して脱溶剤後に得られた混合物に高速攪拌や超音波方法を用いて均質化を行い水中の分散物に加工したが、この分散物は放置後、分散物の分離が認められ、またリポソーム形成時に使用されるエクストルーダーのフィルターに遊離型フラボノイドと思われる結晶が認められ、リポソームが形成されなかった。

一方、逆相蒸発法により薄膜状となったリン脂質およびリン脂質とコレステロールとの混合物に、可溶化された遊離型フラボノイドのアルカリ溶液を添加して、超音波方法を用いて均質化を行って水中の分散物に加工すると安定性の良い乳化液が得られた。この乳化液はリポソーム形成時に使用されるエクストルーダー処理に際し、孔径0.2μmサイズのフィルター通過時に透明溶液に変化し、さらに孔径0.05μmサイズのフィルター通過後にリポソーム形成時に特有に観察される溶液の蛍光が認められた。本リポソーム製剤は淡黄褐色を帶び

た透明溶液であり、粘性は水と同様であり、1ヶ月以上の冷蔵庫保存においても何らの変化は認められなかった。

本リポソーム製剤中には、1ml当たりリン脂質が200mgまで可溶化できる。本発明に用いられるリン脂質は植物起源、動物起源および合成から得られるものいずれでもよい。その分子種に関し、アシル残基は同一および異種でもよく、そのアシル残基の種類には、ラウリン酸、ミリスチン酸、バルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸などが挙げられ、塩基ベースはコリン、エタノールアミン、セリン、イノシトール、グリセロールなどが挙げられるが、特に、製造上は炭素数14~18のアシル残基を有するホスファチジルコリンが好ましい。

本リポソーム製剤中には、1ml当たり遊離型フラボノイドが100mgまで可溶化できる。遊離型フラボノイドの可溶化量は使用するアルカリの使用量とpH値に依存し、塩基性の強いアルカリほど一定量で可溶化できる遊離型フラボノイド量は増加す

るが、その種類の選択は目的によって決められる。本発明に用いられる遊離型フラボノイドのリン脂質に対する使用量は、リポソームの製造のしやすさや生理活性の発現から1～50重量%が好ましく、この際に使用されるアルカリの濃度は0.01～1モルが好ましい。1重量%未満ではフラボノイドの生理効果が得にくくなり、50重量%を超えると安定なりポソームが得られない。

本リポソーム製剤の安定性、血中消失速度の遅延および肝・脾臓への分布抑制などから、コレステロールをさらに添加してもよく、用いられるコレステロールのリン脂質に対する使用量はモル比として1/2、重量比として0.3以下が好ましく、これ以上の添加は製造上好ましくない。

なお、本リポソーム製剤は3ヶ月間冷蔵庫保存しても性状の変化が認められず、実験動物へ腹腔投与しても何らの毒性の発現が認められなかった。

(発明の効果)

本発明の方法によれば、水に不溶性でアプロテック溶剤にしか溶解しなかった生理活性を有する

フラボノイドをリポソーム製剤に加工することが出来るので水溶性液剤となる。

また、本発明によって提供されるリポソーム製剤はフラボノイドを含むリポソームを経静脈、経腹腔によって補給ができるので、生体中に高濃度にフラボノイドを保持し治療を目的とした剤型に利用できる。特に生理活性を有する遊離型フラボノイドを含むので、血小板凝集抑制、血管拡張、抗ヒスタミン、抗炎症、鎮痙、エストロン様、遊離ラジカルのスキャベンジャー等に有効であり、従来水不溶性であるが為にその使用に制限のあった分野にリポソーム剤として利用することができる。

(実施例)

以下、実施例に基づき本発明を具体的に説明する。

実施例1

窒素気流下、ガラスビーズを多数入れた200mlのナスフラスコにジステアロイルホスファチジルコリン200mgを量りとり、エチルアルコール50ml

を添加して加熱攪拌しながら溶解した。エバボレーターで窒素気流下、溶媒を留去し、この残留物に0.02モルの水酸化カリウム(pH13.6)で可溶化されたゲニスタイン(イソフラボン類)80mgを含む水溶液20mlを加え、ボルテックスミキサーで80℃、20分間、超音波乳化を行った。

得られた牛乳様のサスペンションを3.0、2.0、1.0、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1、0.05μmのポアーサイズのフィルターを装着したリポソーム調整用の押出成形機(エクストルーダー)を用い、各ポアーサイズのフィルターごとに5回通過させた。この際、牛乳様のサスペンションは0.2μmのポアーサイズのフィルター通過後から透明溶液となり、0.05μmのポアーサイズのフィルター通過後はリポソーム形成時に特徴的に観察される蛍光が認められた。

得られたリポソーム製剤はpH値9.9であり、淡黄色透明で、水と同様の粘性を示し、1ヶ月以上の冷蔵庫保存においても何らの変化は認められなかった。

実施例2

窒素気流下、ガラスビーズを多数入れた300mlのナスフラスコにジオレイルホスファチジルコリン1,000mgとコレステロール264mgを量りとり、エチルアルコール250mlを添加して加熱攪拌しながら溶解した。エバボレーターで窒素気流下、溶媒を留去し、この残留物に、0.1モルの炭酸ナトリウムpH12.0で可溶化されたアピゲニン(フラボン類)200mgを含む水溶液20mlを加え、その後、実施例1に従って調製した。

得られたリポソーム製剤はpH値9.7であり、淡黄褐色透明で、その他は実施例1と同様であった。

実施例3

窒素気流下、ガラスビーズを多数入れた200mlのナスフラスコにジパルミトイルホスファチジルコリン150mgと大豆ホスファチジルエタノールアミン(97%)23mgとコレステロール27mgを量りとり、エチルアルコール60mlを添加して加熱攪拌しながら溶解した。エバボレーターで窒素気流下、溶媒を留去し、この残留物に0.5モルの醋酸ナト

リウムpH10.9で可溶化させたケンフェロール（フラボノール類）20mgを含む水溶液20mlを加え、その後、実施例1に従って調製した。

得られたりボソーム製剤はpH値9.6であり、淡褐色透明で、その他は実施例1と同様であった。

実施例4

実施例1においてゲニスタインの代わりにゲニスチンを用いた以外は同様に行った。

得られたりボソーム製剤はpH値9.8であり、淡黄色透明で、水と同様の粘性を示し、一ヶ月以上の冷蔵庫保存においても、何らの変化は認められなかった。

（急性毒性（マウス））

体重25～30gの4週令の雌雄のICR系マウス4匹に、実施例1で調製されたリボソーム製剤を、腹腔内に2週間の期間に1回0.4mlずつ7回にわけて投与し、さらに最終投与後7日間観察した。最終投与直後やその1日後に皮膚症状や行動に一部異常が認められたが、最終投与後3～4日後に正常に復し、それ以外は本剤に基因すると思われ

る著明な急性毒性症状を発現したものはなかった。

比較例1

窒素気流下、ガラスピーツを多数入れた200mlのナスフラスコにゲニスタイン80mgを量りとり、ジオキサン／メタノール(7/3v/v)混合液50mlを加えて懸濁させ、さらにジステアロイルホスファチジルコリン200mgを加え、完全に溶解するよう加熱還流した。エバポレーターで窒素気流下、溶媒を留去し、この残留物に精製水20mlを加え、ポルテックスミキサーで80℃、20分間、超音波乳化を行った。

得られた牛乳様のサスペンションを3.0mlのボアーサイズのフィルターを装着したリボソーム調製用の押出成形機（エクストルーダー）で処理したが、ゲニスタインはフィルター上に析出し、透明な滤液が滴下して来た。

比較例2

ゲニスタイン10mgを増粘剤のナトリウムカルボキシメチルセルロースの1%水溶液およびメチルセルソルブの1%水溶液で、さらに膜タンパ

ク質の可溶化に使われる両親媒性界面活性剤の3-((3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ)-1-プロパンスルホネートの1%水溶液で加熱して、別々に均一に懸濁させた。しかし、これらの各溶液は室温放置後、1週間後にゲニスタインの沈殿が認められた。

比較例3

実施例1において、水酸化カリウムのかわりに酢酸ナトリウム(pH9.1)を用いた以外は同様にした。結果はゲニスタインは可溶化せず、沈殿が生じてリボソームが形成されなかった。

特許出願人 日本油脂株式会社

理化学研究所

代理人 弁理士 舟橋栄子

